



TITLE:

小胞体から核への細胞内情報伝達 を伴う転写誘導機構UPRの解析

AUTHOR(S):

森, 和俊

CITATION:

森, 和俊. 小胞体から核への細胞内情報伝達を伴う転写誘導機構UPRの解析. 2002

ISSUE DATE:

2002-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85195>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

小胞体から核への細胞内情報伝達を伴う転写誘導機構 UPR の解析

(12680692)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成 14 年 3 月

森 和俊

(京都大学大学院生命科学研究科助教授)

京 都 大 学 図 書



9810055120

附 属 図 書 館

科研

2001

340

はしがき

小胞体内には種々の分子シャペロンやフォールディング酵素類が恒常的に高いレベルで発現していて、分泌蛋白質や膜蛋白質のフォールディングを促進している。しかしながらいわゆる小胞体ストレス条件下では、このフォールディング過程が阻害され、小胞体内に正しい高次構造をとることのできないアンフォールド蛋白質が蓄積するという異常事態が発生する。このとき細胞は、小胞体シャペロンをコードする遺伝子の転写量を亢進させ、誘導されたシャペロンにより小胞体内のフォールディング容量を増強させて恒常性を維持する。この小胞体から核への細胞内情報伝達を伴う転写誘導機構は Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれており、小胞体ストレスを受けた細胞の生存に必須な応答である。

報告者は、哺乳動物 UPR の標的遺伝子のプロモーター領域を詳細に解析し、転写誘導に関与するシス配列—小胞体ストレス応答エレメント ERSE を世界に先駆けて同定し、平成 10 年に発表した。ERSE のコンセンサス配列は CCAAT-N9-CCACG であり、CCAAT 部分にはユビキタスな転写因子 NF- κ B が結合することから、CCACG 部分が転写誘導の特異性を担う領域であると考えた。次いで報告者は、CCACG 部分に結合する転写因子としてベーシック・ロイシンジッパー構造をもつヒト蛋白質 ATF6 を単離することに成功した。さらに ATF6 は培養細胞において 90kDa の蛋白質 (p90ATF6) として構成的に発現されているが、小胞体ストレスを受けた細胞では 50kDa の蛋白質 (p50ATF6) に変換されることを見出し、この変化に伴って ATF6 の細胞内局在性が劇的に変化することを証明した。つまり p90ATF6 は小胞体に存在する II 型の膜貫通型糖蛋白質であり、p50ATF6 は可溶性の核蛋白質であった。以上の結果から、小胞体ストレスを受けた細胞では ATF6 に特異的なプロテアーゼが働き、小胞体膜に結合した p90ATF6 から、ベーシック・ロイシンジッパードメインを含む N 末端フラグメントが切り出され、生じた p50ATF6 が核内へ移行して標的遺伝子の転写を活性化するというモデルを平成 11 年に世界に先駆けて提唱した。

平成 12 年から 13 年にかけて科学研究費補助金 (C) (2) の交付を受け、この極めて魅力的なモデルを検証し、哺乳動物 UPR における ATF6 のプロテオリシスの重要性を明らかにするために詳細な解析を行った。

研究組織

研究代表者： 森 和俊 (京都大学大学院生命科学研究科)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	2,000	0	2,000
平成13年度	1,700	0	1,700
総計	3,700	0	3,700

研究発表

(1) 学会誌等

(Hiderou Yoshida, ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y(CBF) directly to the *cis*-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response, *Molecular and Cellular Biology*, 20, 6755-6767, 2000)
 (Hiderou Yoshida, Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y(CBF) and activating transcription factors 6 α and 6 β , *Molecular and Cellular Biology*, 21, 1239-1248, 2001)
 (Kiyosuke Haze, Identification of the G13(cAMP response element binding protein-related protein) gene product related to ATF6 as a transcriptional activator, *Biochemical Journal*, 355, 19-28, 2001)
 (Taiichi Katayama, Disturbed Activation of Endoplasmic Reticulum Stress Transducers by Familial Alzheimer's Disease-linked Presenilin-1 Mutations, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 43446-43454, 2001)

(2) 口頭発表

- ・ 森 和俊、「Unfolded protein response と presenilin 変異」、第 73 回日本生化学会大会シンポジウム『タンパク質のリモデリングにおける分子シャペロンとプロテアーゼの接点』、平成 12 年 10 月 13 日
- ・ 森 和俊、「ストレスに応答して小胞体から核へ移行する転写因子 ATF 6」、第 53 回日本細胞生物学会大会シンポジウム『タンパク質の細胞内ダイナミクスと多彩な機能発現』、平成 12 年 11 月 2 日
- ・ 森 和俊、「小胞体におけるタンパク質の品質管理機構」、第 54 回日本細胞生物学会大会ワークショップ『タンパク質の一生—細胞を舞台としたタンパク質の移動と構造変換』、平成 13 年 5 月 31 日
- ・ 森 和俊、「高等動物におけるスプライソソーム非依存的な mRNA スプライシング」、第 24 回日本分子生物学会大会ワークショップ『RNA 分解のダイナミクスと遺伝子制御』、平成 13 年 12 月 9 日

(3) 出版物

該当なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

研究成果

- (1) 細胞を高濃度 (1.0 mM) のジチオスレイトール (ジスルフィド結合を破壊する薬剤) で処理すると、p90ATF6 が効率よく p50ATF6 に変換されることを見出し、この条件を用いた間接免疫蛍光法により、ATF6 のN末端断片がプロテオリシスに伴って実際に小胞体から核へと局在を変化させることを証明した。
- (2) *in vitro* で翻訳した p50ATF6 を用いてゲルシフト法で解析した結果、p50ATF6 は CCACG に単独では結合できないが、CCAAT に NF-Y が結合していると CCACG に結合することを見出した。またこのとき、CCAAT と CCACG の間の距離は9塩基でなければならないことがわかった。
- (3) 哺乳動物の小胞体には ATF6 と構造的によく似た分子がもう一つ発現しており、機能的にも同じ性質を示すことから、従来の ATF6 遺伝子がコードするタンパク質を ATF6 α 、もう一つの G13 (cAMP response element-binding protein-related protein) 遺伝子がコードするタンパク質を ATF6 β と呼ぶよう提唱した。ATF6 α と ATF6 β はともに普遍的に発現している。小胞体に存在する膜貫通型 ATF6 β (p110ATF6 β) はプロテオリシスを受けると核移行型の ATF6 β (p60ATF6 β) に変換される。
- (4) p50ATF6 と p60ATF6 β はホモあるいはヘテロダイマーを形成して ERSE の CCACG に結合する。さらにこのとき NF-Y (A、B、Cの3つのサブユニットからなるヘテロトライマー) のCサブユニットにも結合する。すなわち、ATF6 は DNA と NF-Y の両方に結合することにより安定な転写複合体を形成すると考えられた。
- (5) ERSE の CCACG 部分の点変異体を多数解析した結果、ERSE の p50ATF6あるいはp60ATF6 β 結合活性と小胞体ストレスに応答した転写誘導活性は強く相関することを明らかにした。
- (6) ATF6のプロテオリシスによる活性化を阻害する阻害剤を市販のプロテアーゼ・インヒビターの中からスクリーニングし、セリンプロテアーゼ・インヒビターであるAEBSFが300 μ Mの濃度でかなり特異的な阻害効果を示すことを見いだした。さらにその時、UPRの標的遺伝子であるBiP/GRP78の転写が強く抑制された。
- (7) マイクロアレー技術を用いて UPR の標的遺伝子を網羅的に解析したところ、調べた 2,400 の遺伝子のうち、20 個の遺伝子が小胞体ストレスにより誘導された。活性型の ATF6 を Tet-Off のシステムを用いて発現させてマイクロアレーにより調べると、20 個のうち 10 個の遺伝子が ATF6 により直接制御されており、そのうち8個は小胞体に存在する分子シャペロンやフォールディング酵素であった。すなわち ATF6 の活性化は、小胞体内のフォールディングの容量の増加に直結していることが明確に示された。
- (8) 家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリンに変異が入ると ATF6 の活性化が抑制されることを見だし、プレセニリン変異細胞の小胞体ストレスに対する脆弱性への寄与が示唆された。

以上の結果は、われわれが平成 11 年に打ち立てたモデルの正しさを証明するとともに、ATF6 が哺乳動物 UPR の主要な転写制御因子であることを強く指摘している。